

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-165066
(43)Date of publication of application : 22.06.1999

(51)Int.Cl. B01J 20/24
B01D 15/00
C12H 1/06
C12M 1/00
C12N 1/02
C12P 19/04
C12P 19/34
// C07H 21/00

(21)Application number : 09-366128 (71)Applicant : FUNAYAMA MASASHI
(22)Date of filing : 02.12.1997 (72)Inventor : FUNAYAMA SEIZO
SEKO KAZUHIRO
FUNAYAMA MASASHI

(54) ADSORPTION BODY FOR LIPOPOLYSACCHARIDE, NUCLEIC ACID AND MICROORGANISM

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To enable to absorb lipopolysaccharide, nucleic acid and microorganism in a short time with reduced energy consumption, less occupied space and high absorption performance by immobilizing a chemotherapy drug on an insoluble carrier.

SOLUTION: A film base material for a porous structural body and a nonporous structural body of the insoluble carrier is preferably a cupri-ammonia process regenerated cellulose, a cellulose acetate process regenerated cellulose, a stereocomplex of polymethyl methacrylate, a polyacrylonitrile based polymer, an ethylene-vinyl alcohol based polymer, a chitosan-vinyl alcohol based polymer or the like. As the chemotherapy drug, an amino-sugar based antibiotic and the derivative, an aminocyclitol based antibiotic and the derivative, oclarubicin and the derivative, actionmycin D and the derivative, bacitracin and the derivative, bleomycin and the derivative and the like are preferably used. Immobilization of the chemotherapy drug on the porous structural body and the nonporous structural body is performed preferably by covalent bonding process free from the stripping of the chemotherapy drug, which is a ligand.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

*** NOTICES ***

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] The lipopolysaccharide and the nucleic acid which are characterized by fixing a chemotherapeutic drug in insoluble support, and adsorbent of a microorganism.

[Claim 2] The lipopolysaccharide according to claim 1 characterized by insoluble support being the porous film, a nucleic acid, and adsorbent of a microorganism.

[Claim 3] The lipopolysaccharide according to claim 1 characterized by insoluble support being the nonporous film, a nucleic acid, and adsorbent of a microorganism.

[Claim 4] The lipopolysaccharide according to claim 1 characterized by insoluble support being a porous hollow fiber, a nucleic acid, and adsorbent of a microorganism.

[Claim 5] The lipopolysaccharide according to claim 1 characterized by insoluble support being a nonporous hollow fiber, a nucleic acid, and adsorbent of a microorganism.

[Claim 6] The lipopolysaccharide according to claim 1 characterized by insoluble support consisting of a haemocompatibility material, a nucleic acid, and adsorbent of a microorganism.

[Claim 7] The lipopolysaccharide according to claim 1 characterized by choosing a chemotherapeutic drug from the group which consists of an aminosugar system antibiotic and its derivative, a friend NOSAI chestnut toll system antibiotic and its derivative, aclacinomycin A and its derivative, actinomycin-D and its derivative, bacitracin and its derivative, bleomycin and its derivative, polypeptide antibiotics and its derivative, the doxorubicin and its derivative, the doxycycline and its derivative, mitomycin-C and its derivative, a SUTOREPU toss lysine, and its derivative, a nucleic acid, and adsorbent of a microorganism.

[Claim 8] The lipopolysaccharide in a liquid according to claim 1 characterized by making association with a chemotherapeutic drug and support through a spacer, a nucleic acid, and adsorbent of a microorganism.

[Claim 9] The lipopolysaccharide and the nucleic acid which are characterized by separating the support which fixed the chemotherapeutic drug concerned, and the liquid concerned after contacting lipopolysaccharide, a nucleic acid and/or the liquid containing a microorganism, and the support that fixed the chemotherapeutic drug according to claim 1, and the adsorption treatment approach of a microorganism.

[Translation done.]

*** NOTICES ***

JPO and INPI are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]**[0001]**

[Field of the Invention] This invention relates to the adsorption separation approach of the lipopolysaccharide and the nucleic acid using the lipopolysaccharide which consists of a porous film [which fixed the chemotherapeutic drug], nonporous film, and porosity hollow fiber, or a nonporous hollow fiber in more detail, a nucleic acid, and the adsorbent and the adsorbent concerned of a microorganism, and a microorganism about lipopolysaccharide, a nucleic acid and the lipopolysaccharide that used the adsorbent of a microorganism, and it, a nucleic acid, and the adsorption treatment approach of a microorganism.

[0002]

[Description of the Prior Art] Lipopolysaccharide (following lipopolysaccharide: called endotoxin) is the physiological active substance which constitutes the cell wall of a gram negative, and about 2,000 molecular weight LipidA combined with protein is the core of activity. The adsorption treatment approach of the nucleic acid by chitosan which the adsorption treatment approach of the lipopolysaccharide concerned is considered variously, for example, is indicated by JP,3-109397,A and JP,3-109940,A, and endotoxin is learned. Moreover, the artificers of this invention also invented the adsorption treatment approach of lipopolysaccharide, and have attained to application (patent No. 1865284). Furthermore, the artificers of this invention are application settled also about the adsorbent of the lipopolysaccharide which fixed chemotherapeutic drugs other than an aminosugar system antibiotic, and the adsorbent of the lipopolysaccharide which fixed the chemotherapeutic drug by photochemical reaction. Furthermore, the artificers of this invention invented the quantum approach of lipopolysaccharide, and have attained to application again (patent No. 2690415).

[0003] When lipopolysaccharide trespasses upon the Homo sapiens inside of the body through a parenteral solution etc., a chill, generation of heat, etc. are caused. Moreover, Gram negative bacterium trespasses upon the Homo sapiens inside of the body to which immunological competence fell, the various cures for endotoxin removal are taken against the endotoxinemia produced when a lot of lipopolysaccharide is produced in a Homo sapiens body, and the effectiveness of endotoxin removal is reported by the animal experiment.

[0004] The polymyxin fixed fiber which carried out covalent bond of the polymixin B which is an object antibiotic to polystyrene is used for removal of the lipopolysaccharide of current and the Homo sapiens inside of the body by the direct blood perfusion method (DHP). in a polymyxin fixed fiber packed column, it fills up with 56g polymyxin fixed fiber with a physiological salt solution, and although adsorption of 1.1-microgram lipopolysaccharide of a theory top is enabled, adsorption of 200pg lipopolysaccharide comes out of it at most in fact. Moreover, it is thought that the biocompatibility of polymyxin fixed fiber (polystyrene) is not necessarily enough, adsorption of a platelet is accepted or activation of complement starts it.

[0005] The cause with little amount of adsorption of the lipopolysaccharide to the above-mentioned polymyxin fixed fiber packed column can consider that there is little absolute magnitude of the ligand on a polymyxin fixed fiber packed column, and that the contact time of blood and a polymyxin fixed fiber packed column is short. Moreover, the cause that adsorption of

a platelet is accepted, and the cause by which activation of complement takes place can consider that the haemocompatibility of polymyxin fixed fiber is inadequate, and that the contact time rate of blood and a polymyxin fixed fiber packed column is early.

[0006] Since the adsorption treatment agent (patent No. 1865284) of the lipopolysaccharide which becomes invention of the artificers of this invention fixed the aminosugar system antibiotic in gel (bead), in order to acquire the high rate of flow, it needed to apply high pressure, and had the fault that dynamic adsorption capacity decreased, in the high rate of flow.

[0007] The greatest advantage by dissociating by the film is in energy saving. So, filtration demarcation membranes, such as a reverse osmotic membrane (RO), ultrafiltration membrane (UF), and a membrane filter (MF), are broadly used in fields, such as semi-conductor industry, a pharmaceutical industry, and food stuff industry. On the other hand, it is proposed by Brandt and others that it is going to use porous membrane not as the above filtration film but as adsorbent (782 S. Brandt et al., Bio/Technology, 6,779- 1988).

[0008] It is described that ideal adsorbent for Brandt and others to do adsorption recovery of the protein like a chromatography has thin thickness, and area is the porous big structure, i.e., the porous film. The ideal adsorbent which Brandt and others proposes is a short time, energy saving, and space-saving, and I hear that protein is performed with high recovery, and it is, and can be interpreted as the proposal which is going to attain increase in efficiency (energy saving) by applying the porous structure to the field by which affinity adsorption and separation are carried out using gels, such as current sepharose gel. Brandt and others is producing the porous film which fixed protein A as ligand of protein adsorption (the above-mentioned reference). Moreover, Saito and others has also proposed the porous hollow fiber which carried out radiation graft polymerization of the ligand aiming at protein recovery. extensive production which can make the fixed consistency of ligand high and from which ligand cannot be desorbed easily is possible for the approach concerned — etc. — there is an advantage.

[0009] In the porous hollow fiber for hemodialysis, it is said by making blood throughput per permeable membrane into 4 ml/min - 6 ml/min that it is possible to make the amount of adhesion of a platelet into min (Ken-ichi Kokubo et al.: high performance membrane'96, 52-55). When the blood throughput concerned is converted into the hemodialyzer of 10,000 permeable membrane, it is equivalent to blood throughput 200 ml/min - 300 ml/min. If it is going to realize the blood throughput concerned by gel and the rate of flow is carried out early, the amount of association of the sorbate to ligand decreases extremely, and sufficient adsorption activity cannot be demonstrated like the above-mentioned polymyxin fixed fiber packed column.

[0010]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] The purpose of this invention is in solution of said trouble. That is, it is shown in that it is going to attain increase in efficiency (energy saving) by applying the porous structure to a medical-application way among the fields by which affinity adsorption and separation are carried out using gels, such as current sepharose, and applying the nonporous structure to an industrial way. If it puts in another way, it is in offering the lipopolysaccharide of a short time, energy saving, space-saving, and the high adsorption engine performance, a nucleic acid, and microorganism adsorbent.

[0011]

[Means for Solving the Problem] In order to attain the above-mentioned purpose, as a result of the artificer of this invention repeating various researches, the porous structure (and nonporous structure) which fixed the chemotherapeutic drug carried out adsorption treatment of lipopolysaccharide, a nucleic acid, and the microorganism good, it discovered also fulfilling a short time, energy saving, and space-saving conditions, and this invention was completed.

[0012] That is, this invention has the following configurations.

(1) The lipopolysaccharide and the nucleic acid which are characterized by fixing a chemotherapeutic drug in insoluble support, and adsorbent of a microorganism.

(2) Lipopolysaccharide given in (1) characterized by insoluble support being the porous film, a nucleic acid, and adsorbent of a microorganism.

(3) Lipopolysaccharide given in (1) characterized by insoluble support being the nonporous film, a nucleic acid, and adsorbent of a microorganism.

(4) Lipopolysaccharide given in (1) characterized by insoluble support being a porous hollow fiber, a nucleic acid, and adsorbent of a microorganism.

(5) Lipopolysaccharide given in (1) characterized by insoluble support being a nonporous hollow fiber, a nucleic acid, and adsorbent of a microorganism.

(6) Lipopolysaccharide given in (1) characterized by insoluble support consisting of a haemocompatibility material, a nucleic acid, and adsorbent of a microorganism.

(7) Lipopolysaccharide given in (1) characterized by choosing a chemotherapeutic drug from the group which consists of an aminosugar system antibiotic and its derivative, a friend NOSAI chestnut toll system antibiotic and its derivative, aclacinomycin A and its derivative, actinomycin-D and its derivative, bacitracin and its derivative, bleomycin and its derivative, polypeptide antibiotics and its derivative, the doxorubicin and its derivative, the doxycycline and its derivative, mitomycin-C and its derivative, a SUTOREPU toss lysine, and its derivative, a nucleic acid, and adsorbent of a microorganism.

(8) The lipopolysaccharide in a liquid given in (1) characterized by making association with a chemotherapeutic drug and support through a spacer, a nucleic acid, and adsorbent of a microorganism.

(9) The lipopolysaccharide and the nucleic acid which are characterized by separating the support which fixed the chemotherapeutic drug concerned, and the liquid concerned after contacting lipopolysaccharide, a nucleic acid and/or the liquid containing a microorganism, and the support that fixed the chemotherapeutic drug of a publication in (1), and the adsorption treatment approach of a microorganism.

[0013]

[Embodiment of the Invention] The film material of the porous structure used for the adsorbent of the lipopolysaccharide of this invention, a nucleic acid, and a microorganism, and the imperforation structure A cupro ammonium process regenerated cellulose, a cellulose acetate method regenerated cellulose, The stereo complex of a polymethyl methacrylate, the poly acrylic nitril system, An ethylene-vinyl alcohol system copolymer, a chitosan-vinyl alcohol system copolymer, Although it is desirable that it is in any of synthetic polyamino acid, a playback collagen, polyether carbonate, polysulfone, polyether sulphone, a chitin, chitosan, a polymer alloy, polysulfone, and polymethylmethacrylate, it is not necessarily limited to these. About the material lacked in haemocompatibility among the film materials concerned, it is desirable to use it, giving haemocompatibility.

[0014] Moreover, as for a film gestalt, it is desirable that they are asymmetric membrane or bipolar membrane. Furthermore, it is desirable to be a spiral, to be a hollow filament, or that a modular format is tubular. moreover, a hole — although it is desirable that they are homogeneity structure, gradient structure, or symmetry gradient structure as for structure, it is not necessarily limited to these. The module filled up with the imperforation structure used in addition to a medical-application way does not need the entrance of dialysing fluid.

[0015] As for the chemotherapeutic drug used for the adsorbent of the lipopolysaccharide of this invention, a nucleic acid, and a microorganism, it is desirable to choose from the group which consists of an aminosugar system antibiotic and its derivative, a friend NOSAI chestnut toll system antibiotic and its derivative, aclacinomycin A and its derivative, actinomycin-D and its derivative, bacitracin and its derivative, bleomycin and its derivative, polypeptide antibiotics and its derivative, the doxorubicin and its derivative, the doxycycline and its derivative, mitomycin-C and its derivative, a SUTOREPU toss lysine, and its derivative. When using it in large quantities as an industrial way, it is more desirable to choose the streptomycin of a low price, amikacin, colistin, etc. from these groups.

[0016] Immobilization with the porous structure and the nonporous structure which are used for the adsorbent of the lipopolysaccharide of this invention, a nucleic acid, and a microorganism, and a chemotherapeutic drug has the desirable covalent binding procedure with which the chemotherapeutic drug which is ligand does not exfoliate. As long as it is a covalent binding procedure, which approach may be used among a cyanogen bromide method, the oxirane method, the divinyl sulfone method, the glutaraldehyde method, an acid-anhydride method, the N-hydroxy SAKUSHI imide method, the diazo coupling method, the approach using this reactant bivalence

reagent, the approach using a different reactivity bivalence reagent, a photochemical-reaction method, etc. When the porous structure has a reactant functional group and it does not have a reactant functional group using a covalent binding procedure, it is desirable to use a photochemical-reaction method, a graft polymerization method, etc. Moreover, it is desirable to perform immobilization with the porous structure and the nonporous structure, and a chemotherapeutic drug through spacers, such as a polyethylene glycol and hexa CHIREN diamine, and, as for a spacer, it is more desirable that it is a hydrophilic spacer.

[0017] Use is presented with them, after the porous structure and the nonporous structure in connection with this invention prepared by the above-mentioned approach consider as a module and sterilize. The porous structure concerned is used for lifesaving of a septicemia patient, preparation of a pyrogen free solvent, etc. in a medical field, and the nonporous structure concerned is used for preparation of a pyrogen free-lancer's product, preparation of a pyrogen free-lancer's solvent, etc. in fields, such as a pharmaceutical industry and food stuff industry.

[0018]

[Example] An example explains this invention to a detail further. This invention is not limited at all by the example.

[0019] <<example 1.>>

— Preparation of a streptomycin fixed hollow fiber — The module which fixed streptomycin on the front face inside a hollow fiber was prepared by processing a streptomycin phosphate buffer for the module (2 the bore of 200 micrometers, 20 micrometers of thickness, 195mm of effective length, the pore radius of 80A, 1.6m blood volume of 94ml of effective film surface products) filled up with the hollow filament made from chitosan according to the approach (50 Akio Kishida, raft Yoshito: an artificial organ, 17:47– 1988) of a raft etc. It is distilled water for injection 1,000 further about the interior of the hollow fiber concerned after 100ml of 1 convention sodium-hydroxide solutions washes the interior of the hollow fiber concerned for 5 minutes. It washed by ml. The module concerned was saved by 4-degreeC. The amount of immobilization of the streptomycin to the hollow fiber concerned was 8 microgram/cm⁻².

[0020] <<example 2.>>

— Adsorption of the lipopolysaccharide by the streptomycin fixed hollow fiber — The 1,000ml closed circuit incorporating the streptomycin fixed hollow fiber restoration module which prepared 1,000ml (E. coli O15 origin : 1 ng/ml) of 1% albumin solutions containing lipopolysaccharide, and was prepared in the example 1 was produced. Recycling was carried out in QB=100ml and the sampling was performed after 30 minutes, 60 minutes, and 120 minutes at the time of initiation. The dialysing fluid flow rate was passed by 500 ml/min. LAL activity was measured about sampling liquid. LAL activity was measured by end spacy and the KAINÉ tick method (Seikagaku make). Consequently, the lipopolysaccharide content of a sample was 0.93 ng/ml at the time of initiation. Moreover, each lipopolysaccharide content of an after [120 minutes] sample was below limit of detection after 30 minutes and 60 minutes.

[0021] <<example 3.>>

— Preparation of a colistin fixed hollow fiber — the dialyzer (MC120) which fixed colistin through the polyethylene glycol according to the approach (50 Akio Kishida, raft Yoshito: an artificial organ, 17:47– 1988) of a raft etc. on the front face inside a cellulose wall (KYUPURO fan film) was prepared. It is distilled water for injection 1,000 further about the interior of the hollow fiber concerned after 100ml of 1 convention sodium-hydroxide solutions washes the interior of the dialyzer concerned for 5 minutes. It washed by ml. The amount of immobilization of the colistin to the hollow fiber concerned was 10 microgram/cm⁻².

[0022] <<example 4.>>

— Adsorption of the lipopolysaccharide by the colistin fixed hollow fiber — The 1,000ml closed circuit incorporating the colistin fixed hollow fiber restoration module which prepared 1,000ml (Acinetobacter calcoaceticus origin: 1 ng/ml) of heparinize cow blood containing lipopolysaccharide, and was prepared in the example 3 was produced. Recycling was carried out in QB=100ml and the sampling was performed after 30 minutes, 60 minutes, and 120 minutes at the time of initiation. The dialysing fluid flow rate was passed by 500 ml/min. LAL activity was measured about sampling liquid. LAL activity was measured by end spacy and the KAINÉ tick

method (Seikagaku make). Consequently, the lipopolysaccharide content of a sample was 0.92 ng/ml at the time of initiation. Moreover, each lipopolysaccharide content of an after [120 minutes] sample was below limit of detection after 30 minutes and 60 minutes.

[0023] <<example 5.>>

— Amikacin graft polymerization reaction to a cellulose flat film — The KYUPURO fan film (product made from ENKA) reproduced with the cupro ammonium process was put into the test tube with a stopper, and 20ml (concentration : 10mg/(ml)) of amikacin phosphate buffers and 1ml (nitric-acid acidity) of Ce²⁺ water solutions of 0.1mmol(s) were added. Next, argon gas was blown into the test tube with a stopper concerned for 15 minutes. Next, the test tube with a stopper concerned was made to react with the thermostat of 40-degreeC for 1 hour. Next, 100ml of distilled water for injection washed the KYUPURO fan film concerned. Furthermore, it is distilled water for injection 1,000 further about the KYUPURO fan film concerned after 100ml of 1 convention sodium-hydroxide solutions washes the KYUPURO fan film concerned for 5 minutes. It washed by ml. The amount of immobilization of the amikacin to the hollow fiber concerned was 12 microgram/cm⁻².

[0024] <<example 6.>>

— Adsorption of the lipopolysaccharide by the amikacin graft cellulose flat film It is a spiral mold module (the flat film of two sheets is pasted up in the shape of an envelope) about the amikacin graft cellulose flat film prepared in the example 5. It considers as the thing of the structure involved in the central tube in the shape of a sushi roll with seaweed with the spacers (plastic net etc.) which connect the end opened wide to catchment tubing (central tube with which many holes opened), and pass a feedwater. After 100ml of 1 convention sodium-hydroxide solutions washes the interior of the spiral mold module concerned for 5 minutes, it is distilled water for injection 1,000 further. It washed by ml and considered as the pyrogen free-lancer. 100ml (E. coli O111 origin : 1 ng/ml) of 1% albumin solutions of lipopolysaccharide was applied to the spiral mold module concerned. LAL activity was measured about effluent. LAL activity was measured by end spacy and the KAINÉ tick method (Seikagaku make). The lipopolysaccharide content of effluent was below limit of detection.

[0025] <<example 7.>>

— Preparation of a SUTOREPU toss lysine fixed chitosan hollow fiber — The SUTOREPU toss lysine was fixed by the glutaraldehyde method to the mini module (the outer diameter of 7mm of 0.01mm [of film surface products in dryness] 2 and the bore of 180mm, 15cm of effective length, 120 numbers, and module end jointing, die length of 15mm of module end jointing) filled up with the hollow filament made from chitosan. The amount of immobilization of the SUTOREPU toss lysine to the hollow fiber concerned was 10 microgram/cm⁻².

[0026] <<example 8.>>

— Adsorption of the lipopolysaccharide by the SUTOREPU toss lysine fixed chitosan hollow fiber — Lipopolysaccharide content heparinize cow blood (E. coli O111 origin lipopolysaccharide : 20 ng/ml content) was applied to the SUTOREPU toss lysine fixed chitosan hollow fiber restoration module prepared in the example 7, and the module concerned was passed by rate-of-flow 3 ml/min. The phosphate buffer (pH7.0) was used for dialysing fluid. About the module passage cow blood which carried out perchloric acid processing, the quantum of the lipopolysaccharide was carried out by the Limulus test (the solidifying method: Wako Pure Chem make) and the approach (and spacy: Seikagaku make) by the chromophoric substrate. Lipopolysaccharide was undetectable by neither of the approaches (it was below limit of detection). Moreover, the quantum of lipopolysaccharide was performed by this invention persons' approach (patent No. 2690415) about the module passage cow blood concerned. Lipopolysaccharide was undetectable also by the approach concerned (it was below limit of detection).

[0027] <<example 9.>>

— Amikacin graft polymerization reaction to a KYUPURO fan flat film — a radical polymerization — 2-(4-azide benzoyloxy) ethyl methacrylate: — styrene: — the ternary polymerization object (brewing mole ratio 3:6:1) (henceforth, PASN) of O-nitrobenzyl acrylate was compounded. Ultraviolet rays were irradiated, after applying said PASN to the KYUPURO fan film reproduced

with the cupro ammonium process and forming a thin film. Next, it was immersed in the phosphate buffer solution containing 1% of amikacin, and a water-soluble carbodiimide, and the KYUPURO fan film concerned was made to react at 37 degrees C for 16 hours. Next, 1,000ml of distilled water for injection washed. Next, distilled water for injection 1,000 after the sodium-hydroxide water solution of 1 convention washes the KYUPURO fan film concerned for 5 minutes It washed and dried by ml.

[0028] <<example 10.>>

— Adsorption of the Escherichia coli by the amikacin graft KYUPURO fan flat film It is a SUPARARU mold module (the flat film of two sheets is pasted up in the shape of an envelope) about the amikacin graft KYUPURO fan flat film prepared in the example 9. It considers as the thing of the structure involved in the central tube in the shape of a sushi roll with seaweed with the spacers (plastic net etc.) which connect the end opened wide to catchment tubing (central tube with which many holes opened), and pass a feedwater. After 100ml of sodium-hydroxide water solutions of 1 convention washed for 5 minutes, pyrogen free distilled water fully washed further. 50ml (1x10⁴ cells/ml) of Escherichia coli (E. coli O-157) suspension was made to apply and flow into the module concerned. 0.1ml of effluent was scattered on the ordinary agar plate, and formation of a colony was observed 24 hours after (it carries out about 10ml [of effluent] : 100 sheets). Consequently, Escherichia coli was undetectable about 10ml of effluent.

[0029] <<example 11.>>

— Preparation of a streptomycin fixed carboxyl methyl chitin hollow fiber — Mini module filled up with the carboxyl methyl chitin hollow filament (0.01mm 2 and the bore of 180mm of film surface products in dryness) 16cm of effective length, 100 numbers, the outer diameter of 7mm of module end jointing, It dissolves in the phosphate buffer solution of pH7.4 to the interior with a die length [of module end jointing] of 15mm. The BIS(sulfosucciniml) suberate (BS) (product made from Pierce chemcal Company) solution prepared to 1% of concentration was circulated for 60 minutes. Next, inside the hollow fiber concerned, the phosphate buffer solution was circulated for 30 minutes, and was washed. Next, it dissolved in the phosphate buffer solution of pH7.4 inside the hollow fiber concerned, and the streptomycin solution prepared to 1% of concentration was circulated at 4 degrees C all night. Finally, the interior of the hollow fiber concerned was made to circulate through glycine solution-tris buffers (pH8.0) for 9 hours, the unreacted active group was blocked, and 100ml of phosphate buffers washed. The amount of immobilization of the streptomycin to the hollow fiber concerned was 9 microgram/cm⁻².

[0030] <<example 12.>>

— Adsorption of the Escherichia coli origin DNA by the streptomycin fixed carboxyl methyl chitin hollow fiber — After 100ml of sodium-hydroxide water solutions of 1 convention washed the streptomycin fixed carboxyl methyl chitin hollow fiber prepared in the example 11 for 5 minutes, pyrogen free distilled water fully washed further. 50ml (DAN concentration : 1 microgram/(ml)) of Escherichia coli (E. coli O-157) origin DNA solutions was made to apply and flow into the module concerned. DAN was not detected although DAN was detected about effluent.

[0031] <<example 13.>>

— Preparation of a streptomycin fixed carboxyl methyl chitin hollow fiber — Mini module filled up with the carboxyl methyl chitin hollow filament (0.01mm 2 and the bore of 180mm of film surface products in dryness) 16cm of effective length, 100 numbers, the outer diameter of 7mm of module end jointing, It dissolves in the phosphate buffer solution of pH7.4 to the interior with a die length [of module end jointing] of 15mm. The 1-ethy1-3(3-diethylaminopropyl) carbodiimidehydrochloride (ECD) solution prepared to 1% of concentration was circulated for 60 minutes. Next, inside the hollow fiber concerned, the phosphate buffer solution was circulated for 30 minutes, and was washed. Next, it dissolved in the phosphate buffer solution of pH7.4 inside the hollow fiber concerned, and the streptomycin solution prepared to 1% of concentration was circulated at 4 degrees C for 10 hours. Finally, the interior of the hollow fiber concerned was made to circulate through glycine solution-tris buffers (pH8.0) for 9 hours, the unreacted active group was blocked, and the phosphate buffer washed 3 times. The amount of immobilization of the streptomycin to the hollow fiber concerned was 10 microgram/cm⁻².

[0032] <<example 14.>>

— Adsorption of the Escherichia coli origin DNA by the streptomycin fixed carboxyl methyl chitin hollow fiber — After 100ml of sodium-hydroxide water solutions of 1 convention washed the streptomycin fixed carboxyl methyl chitin hollow fiber prepared in the example 13 for 5 minutes, pyrogen free distilled water fully washed further. 50ml (DAN concentration: 10 pg/ml) of Escherichia coli (E. coli O-157) origin DNA solutions was made to apply and flow into the module concerned. DAN was not detected although DAN was detected about effluent.

[0033] <<example 15.>>

— Preparation of a streptomycin fixed nonporous hollow fiber — The module which fixed streptomycin on the front face was prepared by processing a streptomycin phosphate buffer for the module (2 the bore of 200 micrometers, 20 micrometers of thickness, effective length of 195mm, 1.5m blood volume of 90ml of effective film surface products) filled up with the nonporous hollow filament made from chitosan according to the approach (50 Akio Kishida, raft Yoshito: an artificial organ, 17:47– 1988) of a raft etc. After 100ml of sodium-hydroxide water solutions of 1 convention washed the interior of the dialyzer concerned for 5 minutes, pyrogen free distilled water fully washed further. The amount of immobilization of the streptomycin to the nonporous hollow fiber concerned was 12 microgram/cm².

[0034] <<example 16.>>

— Adsorption of the lipopolysaccharide by the streptomycin fixed nonporous hollow fiber — The 1,000ml closed circuit incorporating the streptomycin fixed nonporous hollow fiber restoration module which prepared 1,000ml (E. coli O15 origin : 1 ng/ml) of 3% interferon solutions containing lipopolysaccharide, and was prepared in the example 15 was produced, and recycling was carried out in QB=100ml. The sampling was performed after 30 minutes, 60 minutes, and 120 minutes at the time of initiation. LAL activity was measured about sampling liquid. LAL activity was measured by end spacy and the KAINE tick method (Seikagaku make). Consequently, the lipopolysaccharide content of a sample was 0.98 ng/ml at the time of initiation. Moreover, each lipopolysaccharide content of an after [120 minutes] sample was below limit of detection after 30 minutes and 60 minutes.

[0035] <<example 17.>>

— Playback of a streptomycin fixed nonporous hollow fiber — 1,000ml (pH4.05+NaCl 1M) of acetic-acid buffer solutions washed the interior of the streptomycin fixed nonporous hollow fiber restoration module used in the example 16. Next, 1,000ml (pH8.0+NaCl1M) of tris-HCl buffer solutions washed the interior of the module concerned. Furthermore, 1,000ml of distilled water for injection washed the interior of the module concerned. Furthermore, after 100ml of sodium-hydroxide water solutions of 1 convention washed the interior of the module concerned for 5 minutes, pyrogen free distilled water fully washed further. The module washed by the approach concerned showed adsorption activity comparable as a new preparation. The module washed by the approach concerned can maintain 90% of adsorption activity of a new preparation to ten washing.

[0036] Example of <<comparison 1.>>

— The Escherichia coli by the mini module filled up with the hollow filament made from Bemberg, Escherichia coli origin lipopolysaccharide, and adsorption test of the Escherichia coli origin DNA

— Pyrogen free distilled water fully washed the mini module (the outer diameter of 7mm of 0.01mm [of film surface products in dryness] 2 and the bore of 180mm, 16cm of effective length, 100 numbers, and module end jointing, die length of 15mm of module end jointing: Asahi Chemical make) filled up with the hollow filament made from Bemberg, and it considered as the pyrogen free-lancer. 50ml (DAN concentration : 8pg / 1 microgram/(ml)) of Escherichia coli (E. coli O-157) origin DNA solutions was made to apply and flow into the module concerned. The dialysing fluid flow rate was passed by 500 ml/min. Most DAN(s) were not adsorbed although DAN was detected about effluent. 50ml (1x10² cells/ml) of Escherichia coli (E. coli O-157) suspension was applied, and it was made to flow out about the mini module concerned. Although Escherichia coli was detected about effluent, most Escherichia coli was not adsorbed. 50ml (E. coli O111 origin : 10 ng/ml) of 1% albumin solutions of lipopolysaccharide content was applied to the module concerned. Although the quantum was performed for lipopolysaccharide about

effluent by the Limulus test (the solidifying method: Wako Pure Chem make) and the approach (and spacy: Seikagaku make) by the chromophoric substrate, nine to 10 ng/ml lipopolysaccharide was detected by any approach.

[0037] Example of <<comparison 2>>

— Comparison of a cellulose-diacetate film dialyzer and amikacin joint SERURO fine ** — According to the approach (dialysis meeting magazines, such as Hiroyoshi etc. Fukui, 26:1267-1273 (1993)) of Fukui etc., the graft polymerization of the amikacin was carried out to the cellulose-diacetate film dialyzer (1.6m [of Meltrax160:film surface products] 2 and the hollow-filament bore of 195 micrometers, 30 micrometers of thickness: product made from a *** medical department). 200ml (1 ng/ml lipopolysaccharide content) of lipopolysaccharide content cow blood which added the sodium citrate (10 ml/l blood) inside the dialyzer concerned was circulated for 2 hours. A physiological salt solution was poured in the hollow filament outside. 5ml bulk blood was isolated preparatively circulation initiation 30 minutes, 1 hour, and 2 hours after. About circulation liquid, the quantum of the lipopolysaccharide was carried out by the Limulus test (the solidifying method: Wako Pure Chem make) and the approach (and spacy: Seikagaku make) by the chromophoric substrate. Lipopolysaccharide was detected from neither the bulk blood 30 minutes after circulation initiation nor the bulk blood 1 hour after circulation initiation nor the bulk blood 2 hours after circulation initiation. Next, 200ml (1 ng/ml lipopolysaccharide content) of lipopolysaccharide content cow blood which added the above-mentioned sodium citrate (10 ml/l blood) to amikacin joint SERURO fine (the amount of amikacin association : 5mg/(ml)) prepared by the approach (patent No. 1865284) of the artificers of this invention was applied, and it was made to flow down by rate-of-flow 1 ml/min. The amount of recovery of the cow blood 1 hour [although the quantum of lipopolysaccharide was performed about the flowing-down liquid 1 hour after flowing-down initiation by the Limulus test (the solidifying method: Wako Pure Chem make) and the approach (and spacy: Seikagaku make) by the chromophoric substrate and lipopolysaccharide was detected by neither of the approaches / by the gel concerned] after flowing-down initiation is 60. It was ml. On the other hand, the cow blood obtained by the above-mentioned amikacin graft film restoration dialyzer 1 hour after circulation initiation was 200ml (lipopolysaccharide content: 1 pg/less than ml).

[0038]

[Effect of the Invention] Adsorption of lipopolysaccharide, a nucleic acid, and a microorganism is possible by the short time, energy saving, space-saving, and the high adsorption engine performance by the porous structure (the porous film and porous hollow fiber) which fixed the chemotherapeutic drug in connection with this invention, and the nonporous structure (the nonporous film and an imperforation hollow fiber: mainly use the porous structure for a medical-application way, and mainly use the nonporous structure for an industrial way.) which fixed the chemotherapeutic drug. Furthermore, the porous structure and the nonporous structure in connection with this invention are the field by which the present affinity adsorption separation is carried out in the future, and are considered to permute by support, such as sepharose.

[Translation done.]

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平11-165066

(43)公開日 平成11年(1999)6月22日

(51)Int.Cl.⁶
B 01 J 20/24
B 01 D 15/00
C 12 H 1/06
C 12 M 1/00
C 12 N 1/02

識別記号

F I
B 01 J 20/24
B 01 D 15/00
C 12 H 1/06
C 12 M 1/00
C 12 N 1/02

C

M

Z

審査請求 未請求 請求項の数9 書面 (全7頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平9-366128

(22)出願日 平成9年(1997)12月2日

(71)出願人 591053328
船山 政志
埼玉県大宮市指扇領別所214-1
(72)発明者 船山 政志
山形県長井市今泉1145番地
(72)発明者 世古 和弘
奈良県奈良市あやめ池北一丁目5~12~2
(72)発明者 船山 政志
埼玉県大宮市指扇領別所214~1

(54)【発明の名称】 リポ多糖、核酸および微生物の吸着体

(57)【要約】

【課題】 短時間、省エネルギー、省スペース、高吸着性能のリポ多糖、核酸および微生物の吸着体を提供する。

【解決手段】 化学療法剤を固定化した多孔性構造体(多孔性膜および多孔性中空纖維)、および化学療法剤を固定化した無孔構造体(無孔膜および無孔性中空纖維)。医療用途に主として多孔性構造体を使用し、産業用途に主として無孔構造体を使用する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 不溶性担体に化学療法剤を固定化したことを特徴とする、リポ多糖、核酸および微生物の吸着体。

【請求項 2】 不溶性担体が多孔性膜であることを特徴とする、請求項 1 記載のリポ多糖、核酸および微生物の吸着体。

【請求項 3】 不溶性担体が無孔膜であることを特徴とする、請求項 1 記載のリポ多糖、核酸および微生物の吸着体。

【請求項 4】 不溶性担体が多孔性中空纖維であることを特徴とする、請求項 1 記載のリポ多糖、核酸および微生物の吸着体。

【請求項 5】 不溶性担体が無孔中空纖維であることを特徴とする、請求項 1 記載のリポ多糖、核酸および微生物の吸着体。

【請求項 6】 不溶性担体が血液適合性素材からなることを特徴とする、請求項 1 記載のリポ多糖、核酸および微生物の吸着体。

【請求項 7】 化学療法剤をアミノ糖系抗生物質およびその誘導体、アミノサイクリトール系抗生物質およびその誘導体、アクラルビシンおよびその誘導体、アクチノマイシンDおよびその誘導体、バシトラシンおよびその誘導体、ブレオマイシンおよびその誘導体、ポリペプチド系抗生物質およびその誘導体、ドキソルビシンおよびその誘導体、ドキシサイクリンおよびその誘導体、マイトマイシンCおよびその誘導体、ストレプトスリシンおよびその誘導体からなる群から選択することを特徴とする、請求項 1 記載のリポ多糖、核酸および微生物の吸着体。

【請求項 8】 化学療法剤と担体との結合がスペーサーを介してなされることを特徴とする、請求項 1 記載の液体中のリポ多糖、核酸および微生物の吸着体。

【請求項 9】 リポ多糖および／または、核酸および／または、微生物を含有する液体と、請求項 1 記載の化学療法剤を固定化した担体とを接触させた後、当該化学療法剤を固定化した担体と、当該液体とを分離することを特徴とする、リポ多糖、核酸および微生物の吸着除去方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、リポ多糖、核酸、および微生物の吸着体とそれを用いたリポ多糖、核酸、および微生物の吸着除去方法に関し、更に詳しくは、化学療法剤を固定化した多孔性膜、無孔膜、多孔性中空纖維または無孔中空纖維から成るリポ多糖、核酸および微生物の吸着体と当該吸着体を用いるリポ多糖、核酸および微生物の吸着分離方法に関する。

【0002】

【従来の技術】リボポリサッカライド（以下リポ多糖：

10

20

30

40

50

エンドトキシンとも呼称される）は、グラム陰性菌の細胞壁を構成する生理活性物質で、蛋白質と結合した分子量約 2,000 の Lipid A が活性の中心である。当該リポ多糖の吸着除去方法が種々検討され、例えば、特開平 3-109397 号公報、特開平 3-109940 号公報に開示される、キトサンによる核酸およびエンドトキシンの吸着除去方法が知られている。また、本発明の発明者らも、リポ多糖の吸着除去方法を発明し、出願に及んでいる（特許第 1865284 号）。更に、本発明の発明者らは、アミノ糖系抗生物質以外の化学療法剤を固定化したリポ多糖の吸着剤、光化学反応により化学療法剤を固定化したリポ多糖の吸着剤についても出願済である。更にまた、本発明の発明者らはリポ多糖の定量方法を発明し、出願に及んでいる（特許第 2690415 号）。

【0003】注射液等を介して、リポ多糖がヒト体内に侵入した場合には、悪寒、発熱等を引き起す。また、免疫能が低下したヒト体内にグラム陰性細菌が侵入し、ヒト体内で大量のリポ多糖が産生された際に生ずるエンドトキシン血症に対しては、エンドトキシン除去の為の種々の対策が講じられ、動物実験では、エンドトキシン除去の有効性が報告されている。

【0004】現在、ヒト体内のリポ多糖の除去には、物抗生物質であるポリミキシン B をポリスチレンに共有結合したポリミキシン固定化纖維が、直接血液灌流法（DHP）によって使用されている。ポリミキシン固定化纖維充填カラム内には、56 グラムのポリミキシン固定化纖維が生理食塩液と共に充填され、理論上は 1.1 マイクログラムのリポ多糖の吸着が可能であるとされているが実際には、200 ピコグラムのリポ多糖の吸着が精々である。また、ポリミキシン固定化纖維（ポリスチレン）の生体適合性は必ずしも充分ではなく、血小板の吸着が認められたり、補体の活性化がおこるものと考えられている。

【0005】上記のポリミキシン固定化纖維充填カラムへのリポ多糖の吸着量が少ない原因是、ポリミキシン固定化纖維充填カラム上のリガンドの絶対量が少ないと、血液とポリミキシン固定化纖維充填カラムとの接触時間が短いことが考えられる。また、血小板の吸着が認められる原因、および補体の活性化が起こる原因は、ポリミキシン固定化纖維の血液適合性が不充分であること、血液とポリミキシン固定化纖維充填カラムとの接触時間速度が早いことが考えられる。

【0006】本発明の発明者らの発明になるリポ多糖の吸着除去剤（特許第 1865284 号）は、ゲル（ビーズ）にアミノ糖系抗生物質を固定化している為、高流速を得る為には高圧をかけることが必要で、高流速では動的吸着容量が減少するという欠点があった。

【0007】膜で分離を行なうことによる最大の利点は、省エネルギーにある。それ故に、逆浸透膜（R

O)、限外ろ過膜(UF)、精密ろ過膜(MF)等のろ過分離膜は、半導体工業、医薬品工業、食品工業等の分野で幅広く使用されている。一方、多孔質膜を上記の様なろ過膜としてではなく、吸着体として利用しようとすることがBrandtらによって提案されている(S. Brandt et al., Bio/Technology, 6, 779-782, 1988)。

【0008】Brandtらは、蛋白質をクロマトグラフィーの様に吸着回収する為の理想的な吸着体は、厚みが薄く、面積が大きな多孔性構造体すなわち多孔性膜であると記述している。Brandtらの提案する理想的な吸着体とは、短時間、省エネルギー、省スペースで、高回収率で蛋白質を行なうということであり、現在セファロースゲル等のゲルを用いてアフィニティー吸着、分離が実施されている分野に多孔性構造体を応用することで効率化(省エネルギー)を図ろうとする提案と解釈できる。Brandtらは、蛋白吸着のリガンドとしてプロテインAを固定化した多孔性膜を作製している(上記文献)。また、斎藤らも蛋白質回収を目的とした、リガンドを放射線グラフト重合した多孔性中空糸膜を提案している。当該方法は、リガンドの固定密度を高くできる、リガンドが脱離しにくい、大量作製が可能である等の利点がある。

【0009】血液透析用の多孔性中空糸膜では、透析膜1本当たりの血液処理量を $4\text{ ml}/\text{min} \sim 6\text{ ml}/\text{min}$ にすることにより、血小板の粘着量を最小にすることが可能であると言われている(小久保謙一ら:ハイパフォーマンスマンプレン'96, 52~55)。当該血液処理量は透析膜10,000本の血液透析器に換算すると血液処理量 $200\text{ ml}/\text{min} \sim 300\text{ ml}/\text{min}$ に相当する。当該血液処理量をゲルで実現しようとして、流速を早くするとリガンドへの被吸着物質の結合量が極端に少なくなり、上記ポリミキシン固定化纖維充填カラムの様に、充分な吸着活性が発揮できない。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は前記問題点の解決にある。即ち、現在セファロース等のゲルを用いてアフィニティー吸着、分離が実施されている分野のうち、医療用途には多孔性構造体を応用し、産業用途に無孔構造体を応用することで効率化(省エネルギー)を図ろうすることにある。換言すれば、短時間、省エネルギー、省スペース、高吸着性能のリポ多糖、核酸および微生物吸着体を提供することにある。

【0011】

【課題を解決するための手段】上記目的を達成する為、本発明の発明者は種々研究を重ねた結果、化学療法剤を固定化した多孔性構造体(および無孔構造体)が、リポ多糖、核酸および微生物を良好に吸着除去し、短時間、省エネルギー、省スペースの条件をも満たすことを発見し、本発明を完成した。

【0012】即ち、本発明は以下の様な構成を有するものである。

- (1) 不溶性担体に化学療法剤を固定化したことを特徴とする、リポ多糖、核酸および微生物の吸着体。
- (2) 不溶性担体が多孔性膜であることを特徴とする、(1)に記載のリポ多糖、核酸および微生物の吸着体。
- (3) 不溶性担体が無孔膜であることを特徴とする、(1)に記載のリポ多糖、核酸および微生物の吸着体。
- (4) 不溶性担体が多孔性中空纖維であることを特徴とする、(1)に記載のリポ多糖、核酸および微生物の吸着体。
- (5) 不溶性担体が無孔中空纖維であることを特徴とする、(1)に記載のリポ多糖、核酸および微生物の吸着体。

(6) 不溶性担体が血液適合性素材からなることを特徴とする、(1)に記載のリポ多糖、核酸および微生物の吸着体。

(7) 化学療法剤をアミノ糖系抗生物質およびその誘導体、アミノサイクリトール系抗生物質およびその誘導体、アクララルビシンおよびその誘導体、アクチノマイシンDおよびその誘導体、バシトラシンおよびその誘導体、ブレオマイシンおよびその誘導体、ポリペプチド系抗生物質およびその誘導体、ドキソルビシンおよびその誘導体、ドキシサイクリンおよびその誘導体、マイトマイシンCおよびその誘導体、ストレプトスリシンおよびその誘導体からなる群から選択することを特徴とする、(1)に記載のリポ多糖、核酸および微生物の吸着体。

(8) 化学療法剤と担体との結合がスペーサーを介してなされることを特徴とする、(1)に記載の液体中のリポ多糖、核酸および微生物の吸着体。

(9) リポ多糖および/または、核酸および/または、微生物を含有する液体と、(1)に記載の化学療法剤を固定化した担体とを接触させた後、当該化学療法剤を固定化した担体と、当該液体とを分離することを特徴とする、リポ多糖、核酸および微生物の吸着除去方法。

【0013】

【発明の実施の形態】本発明のリポ多糖、核酸および微生物の吸着体に使用される多孔性構造体および無孔性構造体の膜素材は、銅アンモニア法再生セルロース、酢酸セルロース法再生セルロース、ポリメタクリル酸メチルのステレオコンプレックス、ポリアクリルニトリル系、エチレン-ビニルアルコール系共重合体、キトサン-ビニルアルコール系共重合体、合成ポリアミノ酸、再生コラーゲン、ポリエーテルカーボネート、ポリスルホン、ポリエーテルスルホン、キチン、キトサン、ポリマーアロイ、ポリスルホン、ポリメチルメタクリレートの何れかであることが好ましいが、必ずしもこれらに限定される訳ではない。当該膜素材のうち、血液適合性を欠如する素材については、血液適合性を付与して使用することが好ましい。

【0014】また、膜形態は非対称膜または複合膜であることが好ましい。更に、モジュールの形式は、スパイラル、中空糸または管状であることが好ましい。また、孔構造は、均質構造、グラジェント構造、または対称グラジェント構造であることが好ましいが、必ずしもこれらに限定される訳ではない。医療用途以外に用いる無孔性構造体を充填するモジュールは、透析液の出入口を必要としない。

【0015】本発明のリポ多糖、核酸および微生物の吸着体に使用される化学療法剤は、アミノ糖系抗生物質およびその誘導体、アミノサイクリトール系抗生物質およびその誘導体、アクラルビシンおよびその誘導体、アクリノマイシンDおよびその誘導体、バシトラシンおよびその誘導体、ブレオマイシンおよびその誘導体、ポリペプチド系抗生物質およびその誘導体、ドキソルビシンおよびその誘導体、ドキシサイクリンおよびその誘導体、マイトイシンCおよびその誘導体、ストレプトスリシンおよびその誘導体からなる群から選択することが好ましい。産業用途として大量に使用する場合は、これらの群のなかから、低価格のストレプトマイシン、アミカシン、コリスチン等を選択することがより好ましい。

【0016】本発明のリポ多糖、核酸および微生物の吸着体に使用される多孔性構造体および無孔構造体と化学療法剤との固定化は、リガンドである化学療法剤が剥離することのない共有結合法が好ましい。共有結合法であれば、臭化シアン法、オキシラン法、ジビニルスルホン法、グルタルアルデヒド法、酸無水物法、N-ヒドロキシサクシミド法、ジアゾカップリング法、同反応性二価試薬を用いる方法、異反応性二価試薬を用いる方法、光化学反応法等のうち何れの方法を用いても良い。多孔性構造体が反応性官能基を有する場合には、共有結合法を用い、反応性官能基を有しない場合には、光化学反応法、グラフト重合法等を用いることが好ましい。また、多孔性構造体および無孔構造体と化学療法剤との固定化は、ポリエチレンギリコール、ヘキサチレンジアミン等のスペーサーを介して行なうことが好ましく、スペーサーは親水性スペーサーであることがより好ましい。

【0017】上記方法により調製した本発明にかかる多孔性構造体および無孔構造体は、モジュールとし滅菌した後使用に供する。当該多孔性構造体は、医療領域では敗血症患者の救命、バイロジエンフリー溶媒の調製等に使用され、当該無孔構造体は、医薬品工業、食品工業等の分野ではバイロジエンフリーの製品の調製、バイロジエンフリーの溶媒の調製等に使用される。

【0018】

【実施例】本発明を実施例により更に詳細に説明する。本発明は実施例により、何ら限定されるものではない。

【0019】《実施例1.》

—ストレプトマイシン固定化中空糸膜の調製—
キトサン製中空糸を充填したモジュール（内径200マ

10

20

30

40

50

イクロメーター、膜厚20マイクロメーター、有効長195mm、ポア半径80オングストローム、有効膜面積1.6m²、血液容量94ml）を筏等の方法（岸田晶夫、筏義人：人工臓器、17：47～50、1988）に準じて、ストレプトマイシン磷酸緩衝液を処理することにより、中空糸膜内部の表面にストレプトマイシンを固定化したモジュールを調製した。当該中空糸膜の内部を1規定水酸化ナトリウム溶液100mlで5分間洗浄した後、当該中空糸膜の内部を更に、注射用蒸留水1,000mlで洗浄した。当該モジュールは4°Cで保存した。当該中空糸膜へのストレプトマイシンの固定化量は8マイクログラム/cm²であった。

【0020】《実施例2.》

—ストレプトマイシン固定化中空糸膜によるリポ多糖の吸着—
リポ多糖を含有する1%アルブミン溶液（*E. coli* O15由来：1ng/ml）1,000mlを調製し、実施例1で調製したストレプトマイシン固定化中空糸膜充填モジュールを組み込んだ1,000mlの閉鎖回路を作製した。Q_B = 100mlにて再循環させ、サンプリングは開始時、30分後、60分後、120分後に進行した。透析液流量は500ml/minで流した。サンプリング液についてLAL活性を測定した。LAL活性はエンドスペーザー、カイネティック法（生化学工業製）で測定した。その結果、開始時サンプルのリポ多糖含量は、0.93ng/mlであった。また、30分後、60分後、120分後サンプルのリポ多糖含量は、何れも検出限界以下であった。

【0021】《実施例3.》

—コリスチン固定化中空糸膜の調製—
セルロース膜（キュプロファン膜）の内部の表面に筏等の方法（岸田晶夫、筏義人：人工臓器、17：47～50、1988）に準じて、ポリエチレンギリコールを介してコリスチンを固定化したダイアライザ（MC120）を調製した。当該ダイアライザの内部を1規定水酸化ナトリウム溶液100mlで5分間洗浄した後、当該中空糸膜の内部を更に、注射用蒸留水1,000mlで洗浄した。当該中空糸膜へのコリスチンの固定化量は10マイクログラム/cm²であった。

【0022】《実施例4.》

—コリスチン固定化中空糸膜によるリポ多糖の吸着—
リポ多糖を含有するヘパリン添加ウシ血液（*A. equi* *tobacter calcoaceticus*由来：1ng/ml）1,000mlを調製し、実施例3で調製したコリスチン固定化中空糸膜充填モジュールを組み込んだ1,000mlの閉鎖回路を作製した。Q_B = 100mlにて再循環させ、サンプリングは開始時、30分後、60分後、120分後に進行した。透析液流量は500ml/minで流した。サンプリング液について

LAL活性を測定した。LAL活性はエンドスペーシー、カイネティック法(生化学工業製)で測定した。その結果、開始時サンプルのリポ多糖含量は、0.92ng/mlであった。また、30分後、60分後、120分後サンプルのリポ多糖含量は、何れも検出限界以下であった。

【0023】《実施例5.》

-- セルロース平膜へのアミカシングラフト重合反応 --

銅アンモニア法により再生したキュプロファン膜(EN KA製)を共栓付試験管に入れ、アミカシン磷酸緩衝液(濃度: 10mg/ml) 20mlと0.1mmolのCe²⁺水溶液(硝酸酸性) 1mlとを添加した。次に、当該共栓付試験管にアルゴンガスを15分間吹き込んだ。次に、当該共栓付試験管を40°Cの恒温槽で1時間反応させた。次に、当該キュプロファン膜を注射用蒸留水100mlで洗浄した。更に、当該キュプロファン膜を1規定水酸化ナトリウム溶液100mlで5分間洗浄した後、当該キュプロファン膜を更に、注射用蒸留水1,000mlで洗浄した。当該中空糸膜へのアミカシンの固定化量は12マイクログラム/cm⁻²であった。

【0024】《実施例6.》

-- アミカシングラフトセルロース平膜によるリポ多糖の吸着 --

実施例5で調製したアミカシングラフトセルロース平膜をスパイラル型モジュール(2枚の平膜を封筒状に接着し、開放された一端を集水管(穴の多数あいた中心パイプ)に接続して供給水流すスペーサー(プラスチックネット等)と共に中心パイプにのり巻き状に巻き込んだ構造のもの)とし、当該スパイラル型モジュールの内部を1規定水酸化ナトリウム溶液100mlで5分間洗浄した後、更に、注射用蒸留水1,000mlで洗浄し、パイロジエンフリーとした。当該スパイラル型モジュールにリポ多糖1%アルブミン溶液(E. coli O111由来: 1ng/ml) 100mlをアプライした。流出液についてLAL活性を測定した。LAL活性はエンドスペーシー、カイネティック法(生化学工業製)で測定した。流出液のリポ多糖含量は、検出限界以下であった。

【0025】《実施例7.》

-- ストレプトストリシン固定化キトサン中空糸膜の調製 --

キトサン製中空糸を充填したミニモジュール(乾燥状態での膜面積0.01mm²、内径180mm、有効長15cm、本数120本、モジュール末端接着部の外径7mm、モジュール末端接着部の長さ15mm)にグルタルアルデヒド法により、ストレプトストリシンを固定化した。当該中空糸膜へのストレプトストリシンの固定化量は10マイクログラム/cm⁻²であった。

10

20

30

40

50

【0026】《実施例8.》

-- ストレプトストリシン固定化キトサン中空糸膜によるリポ多糖の吸着 --

実施例7で調製したストレプトストリシン固定化キトサン中空糸膜充填モジュールにリポ多糖含有ヘパリン添加ウシ血液(E. coli O111由来リポ多糖: 20ng/ml含有)をアプライし、流速3ml/minで当該モジュールを通過させた。透析液には磷酸緩衝液(pH 7.0)を用いた。過塩素酸処理したモジュール通過ウシ血液について、リムルステスト(凝固法: 和光純薬製)、および発色基質による方法(エンドスペーシー: 生化学工業製)でリポ多糖を定量した。何れの方法でもリポ多糖は検出出来なかつた(検出限界以下であつた)。また、当該モジュール通過ウシ血液について、本発明者らの方法(特許第2690415号)によりリポ多糖の定量を行なつた。当該方法でもリポ多糖は検出出来なかつた(検出限界以下であつた)。

【0027】《実施例9.》

-- キュプロファン平膜へのアミカシングラフト重合反応 --

ラジカル重合により2-(4-アジドベンゾイルオキシ)エチルメタクリレート: スチレン: O-ニトロベンジルアクリレートの三元共重合体(仕込モル比3:6:1)(以下PASN)を合成した。銅アンモニア法により再生したキュプロファン膜に、前記PASNを塗布、薄膜を形成した後、紫外線を照射した。次に当該キュプロファン膜を1%のアミカシンと水溶性カルボジイミドを含有するリン酸緩衝液に浸漬し、37°Cで16時間反応させた。次に、注射用蒸留水1,000mlで洗浄した。次に当該キュプロファン膜を1規定の水酸化ナトリウム水溶液で5分間洗浄した後、注射用蒸留水1,000mlで洗浄、乾燥した。

【0028】《実施例10.》

-- アミカシングラフトキュプロファン平膜による大腸菌の吸着 --

実施例9で調製したアミカシングラフトキュプロファン平膜をスパイラル型モジュール(2枚の平膜を封筒状に接着し、開放された一端を集水管(穴の多数あいた中心パイプ)に接続して供給水流すスペーサー(プラスチックネット等)と共に中心パイプにのり巻き状に巻き込んだ構造のもの)とし、1規定の水酸化ナトリウム水溶液100mlで5分間洗浄した後、更にパイロジエンフリー蒸留水で充分に洗浄した。当該モジュールに大腸菌(E. coli O157)懸濁液(1×10⁴cfu/ml) 50mlをアプライし流出させた。流出液0.1mlを普通寒天平板に撒き、24時間後にコロニーの形成を観察した(流出液10ml: 100枚について実施)。その結果、流出液10mlについて大腸菌は検出出来なかつた。

50 【0029】《実施例11.》

—ストレプトマイシン固定化カルボキシルメチルキチン中空糸膜の調製—

カルボキシルメチルキチン製中空糸を充填したミニモジュール（乾燥状態での膜面積0.01mm²、内径180mm、有効長16cm、本数100本、モジュール末端接着部の外径7mm、モジュール末端接着部の長さ15mm）の内部にpH7.4のリン酸緩衝液に溶解し、1%の濃度に調製したBIS (sulfosuccinimyl) suberate (BS) (Pierce chemical Company社製) 溶液を60分間循環させた。次に、当該中空糸膜の内部にリン酸緩衝液を30分間循環させ、洗浄した。次に、当該中空糸膜の内部にpH7.4のリン酸緩衝液に溶解し、1%の濃度に調製したストレプトマイシン溶液を4℃で終夜、循環させた。最後に、当該中空糸膜の内部にグリシン溶液ト里斯緩衝液(pH8.0)を9時間循環させ、未反応の活性基をブロックし、磷酸緩衝液100mlで洗浄した。当該中空糸膜へのストレプトマイシンの固定化量は9マイクログラム/cm⁻²であった。

【0030】《実施例12.》

—ストレプトマイシン固定化カルボキシルメチルキチン中空糸膜による大腸菌由来DNAの吸着—
実施例11で調製したストレプトマイシン固定化カルボキシルメチルキチン中空糸膜を1規定の水酸化ナトリウム水溶液100mlで5分間洗浄した後、更にパイロジエンフリー蒸留水で充分に洗浄した。当該モジュールに大腸菌(E. coli O157)由来DNA溶液(DAN濃度：1マイクログラム/ml)50mlをアプライ、流出させた。流出液についてDANの検出を行なったが、DANは検出されなかった。

【0031】《実施例13.》

—ストレプトマイシン固定化カルボキシルメチルキチン中空糸膜の調製—
カルボキシルメチルキチン製中空糸を充填したミニモジュール（乾燥状態での膜面積0.01mm²、内径180mm、有効長16cm、本数100本、モジュール末端接着部の外径7mm、モジュール末端接着部の長さ15mm）の内部にpH7.4のリン酸緩衝液に溶解し、1%の濃度に調製した1-ethyl-3-(3-dieethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (ECD) 溶液を60分間循環させた。次に、当該中空糸膜の内部にリン酸緩衝液を30分間循環させ、洗浄した。次に、当該中空糸膜の内部にpH7.4のリン酸緩衝液に溶解し、1%の濃度に調製したストレプトマイシン溶液を4℃で10時間循環させた。最後に、当該中空糸膜の内部にグリシン溶液ト里斯緩衝液(pH8.0)を9時間循環させ、未反応の活性基をブロックし、磷酸緩衝液で3回洗浄した。当該中空糸膜へのストレプトマイシンの固定化量は10マイクログラム/cm⁻²であった。

【0032】《実施例14.》

—ストレプトマイシン固定化カルボキシルメチルキチン中空糸膜による大腸菌由来DNAの吸着—
実施例13で調製したストレプトマイシン固定化カルボキシルメチルキチン中空糸膜を1規定の水酸化ナトリウム水溶液100mlで5分間洗浄した後、更にパイロジエンフリー蒸留水で充分に洗浄した。当該モジュールに大腸菌(E. coli O157)由来DNA溶液(DAN濃度：10pg/ml)50mlをアプライ、流出させた。流出液についてDANの検出を行なったが、DANは検出されなかった。

【0033】《実施例15.》

—ストレプトマイシン固定化無孔中空糸膜の調製—

キトサン製無孔中空糸を充填したモジュール（内径200マイクロメーター、膜厚20マイクロメーター、有効長195mm、有効膜面積1.5m²、血液容量90ml）を筏等の方法（岸田晶夫、筏義人：人工臓器、17：47～50、1988）に準じて、ストレプトマイシン磷酸緩衝液を処理することにより、表面にストレプトマイシンを固定化したモジュールを調製した。当該ダイアライザーの内部を1規定の水酸化ナトリウム水溶液100mlで5分間洗浄した後、更にパイロジエンフリー蒸留水で充分に洗浄した。当該無孔中空糸膜へのストレプトマイシンの固定化量は12マイクログラム/cm⁻²であった。

【0034】《実施例16.》

—ストレプトマイシン固定化無孔中空糸膜によるリポ多糖の吸着—

30 リポ多糖を含有する3%インターフェロン溶液(E. coli O15由来：1ng/ml)1,000mlを調製し、実施例15で調製したストレプトマイシン固定化無孔中空糸膜充填モジュールを組み込んだ1,000mlの閉鎖回路を作製し、Q_b = 100mlにて再循環させた。サンプリングは開始時、30分後、60分後、120分後に行なった。サンプリング液についてLAL活性を測定した。LAL活性はエンドスペーサー、カイネティック法（生化学工業製）で測定した。その結果、開始時サンプルのリポ多糖含量は、0.98ng/mlであった。また、30分後、60分後、120分後サンプルのリポ多糖含量は、何れも検出限界以下であった。

【0035】《実施例17.》

—ストレプトマイシン固定化無孔中空糸膜の再生—

40 実施例16で使用したストレプトマイシン固定化無孔中空糸膜充填モジュールの内部を酢酸緩衝液(pH4.05+NaCl 1M)1,000mlで洗浄した。次に当該モジュールの内部をトリス-HCl緩衝液(pH8.0+NaCl 1M)1,000mlで洗浄した。更に当該モジュールの内部を注射用蒸留水1,000ml

で洗浄した。更に当該モジュールの内部を1規定の水酸化ナトリウム水溶液100mlで5分間洗浄した後、更にバイロジエンフリー蒸留水で充分に洗浄した。当該方法により洗浄したモジュールは、新規調製品と同程度の吸着活性を示した。当該方法により洗浄したモジュールは、洗浄10回迄新規調製品の90%の吸着活性を維持することが可能であった。

【0036】《比較例1.》

—ベンベルグ製中空糸を充填したミニモジュールによる大腸菌、大腸菌由来リポ多糖および大腸菌由来DNAの吸着試験—

ベンベルグ製中空糸を充填したミニモジュール（乾燥状態での膜面積0.01mm²、内径180mm、有効長16cm、本数100本、モジュール末端接着部の外径7mm、モジュール末端接着部の長さ15mm：旭化成製）をバイロジエンフリー蒸留水で充分に洗浄し、バイロジエンフリーとした。当該モジュールに大腸菌（E. coli O157）由来DNA溶液（DAN濃度：8pg/1マイクログラム/ml）50mlをアプライし流出させた。透析液流量は500ml/minで流した。流出液についてDANの検出を行なったが、DANは殆ど吸着されなかった。当該ミニモジュールについて、大腸菌（E. coli O157）懸濁液（1×10²cells/ml）50mlをアプライし、流出させた。流出液について大腸菌の検出を行なったが、大腸菌は殆ど吸着されなかった。当該モジュールにリポ多糖含有1%アルブミン溶液（E. coli O111由来：10ng/ml）50mlをアプライした。流出液についてリムルステスト（凝固法：和光純薬製）、および発色基質による方法（エンドスペーシー：生化学工業製）でリポ多糖を定量を行なったが、何れの方法でも9~10ng/mlのリポ多糖が検出された。

【0037】《比較例2.》

—セルロースジアセテート膜ダイアライザーとアミカシン結合セルロファインとの比較—

セルロースジアセテート膜ダイアライザー（Meltrex 160：膜面積1.6m²、中空糸内径195マイクロメーター、膜厚30マイクロメーター：泉工医科製）に福井等の方法（福井博義等、透析会誌、26：1*

* 267~1273（1993）に準じて、アミカシンをグラフト重合させた。当該ダイアライザーの内側に、クエン酸ナトリウム（10ml/1血液）を加えたリポ多糖含有ウシ血液200ml（リポ多糖含量1ng/ml）を2時間循環させた。中空糸外側には、生理食塩液を流した。循環開始30分、1時間、2時間後に5mlのバルク血液を分取した。循環液について、リムルステスト（凝固法：和光純薬製）、および発色基質による方法（エンドスペーシー：生化学工業製）でリポ多糖を定量した。循環開始30分後のバルク血液、循環開始1時間後のバルク血液、循環開始2時間後のバルク血液の何れからもリポ多糖は検出されなかつた。次に、本発明の発明者らの方法（特許第1865284号）により調製したアミカシン結合セルロファイン（アミカシン結合量：5mg/ml）に上記クエン酸ナトリウム（10ml/1血液）を加えたリポ多糖含有ウシ血液200ml（リポ多糖含量1ng/ml）をアプライし、流速1ml/minで流下させた。流下開始1時間後の流下液について、リムルステスト（凝固法：和光純薬製）、および発色基質による方法（エンドスペーシー：生化学工業製）でリポ多糖の定量を行なったが、何れの方法でもリポ多糖は検出されなかつたが、当該ゲルによる流下開始1時間後のウシ血液の回収量は、60mlであった。一方、上記アミカシングラフト膜充填ダイアライザーにより、循環開始1時間後に得られたウシ血液は200ml（リポ多糖含量：1pg/ml以下）であった。

【0038】

【発明の効果】本発明にかかる化学療法剤を固定化した多孔性構造体（多孔性膜および多孔性中空纖維）、および化学療法剤を固定化した無孔構造体（無孔膜および無孔性中空纖維：医療用途に主として多孔性構造体を使用し、産業用途に主として無孔構造体を使用する。）により、短時間、省エネルギー、省スペース、高吸着性能でリポ多糖、核酸および微生物の吸着が可能である。更に、本発明にかかる多孔性構造体および無孔構造体は、将来は、現在アフィニティー吸着分離が実施されている分野で、セファロース等の担体に置換されるものと考えられる。

フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁶

識別記号

C 12 P 19/04

19/34

// C 07 H 21/00

F I

C 12 P 19/04

19/34

C 07 H 21/00

Z

Z